

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：82706

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25247092

研究課題名(和文) アミノ酸の放射性炭素年代による堆積物年代測定法の確立

研究課題名(英文) Development of sediment chronologies with amino acid radiocarbon dating

研究代表者

大河内 直彦 (Ohkouchi, Naohiko)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・生物地球化学研究分野・分野長

研究者番号：00281832

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,400,000円

研究成果の概要(和文)：堆積物中に含まれるアミノ酸の放射性炭素年代を用いた年代測定法を構築するため、高速液体クロマトグラフィーによる分離と分取コレクターを用いたアミノ酸の単離が最も適切であることを明らかにした。さらに、単離されたアミノ酸に含まれる汚染物質を取り除き精製するために再結晶化法が有効であることを明らかにした。また、100 µgC以下の微量放射性炭素年代測定技術を確立した。これらの新規技術開発をもとに、年代既知の各種天然物中からアミノ酸を単離・精製し、その放射性炭素年代を測定した。測定結果は、予測された年代と極めて良い一致を示し、この方法論が天然物の年代測定に応用できることを示した。

研究成果の概要(英文)：We have developed a method to isolate and purify amino acids from the natural materials including sediments for radiocarbon measurement. HPLC/fraction collection and the following recrystallization are useful methods for this purpose. Based on the method we have developed, we measured amino acids from known-aged natural samples. The obtained radiocarbon ages are quite consistent with the expected ages. The results suggested that the radiocarbon age of amino acids are useful for the chronological tool.

研究分野：古海洋学，地球化学

キーワード：放射性炭素年代

1. 研究開始当初の背景

海底堆積物の詳細な年代測定は通常、炭酸カルシウム殻（主に有孔虫）化石を用いて行われてきた。しかし、世界の海底堆積物の約半分はこの炭酸カルシウム殻化石がほとんど含まれていない。特に太平洋ではほとんどの深海域は CCD (Carbonate Compensation Depth) 以深にあり、沿岸や一部の外洋を除いて炭酸カルシウムに富む堆積物は非常に少ない(図1)。

また、両極海域の極前線より極側においては、そもそも海洋表層水中において、炭酸カルシウム殻を合成する生物が棲息しないため、堆積物中に炭酸カルシウム殻化石がほとんど含まれていない。このような海域では、堆積物コアの年代決定はきわめて不確実性の高い仮定のもとで行われることが多く、過去数十年にわたって海底堆積物を用いた古環境研究の大きな足かせとなってきた。さらに湖沼堆積物においても同様のことが言える。湖沼では、炭酸カルシウム殻を合成する貝類などがほとんど棲息しないため、湖沼で採取された堆積物コアも、植物破片などが含まれない場合、その詳細な年代は決まらない。このことが、陸上の気候変動の編年を難しくしているだけでなく、海洋の気候変動記録との対比を困難にしている。多額の予算を投じてコアリングしたにもかかわらず、その古環境アーカイブがもつ潜在性を十分に引き出せていないのが実情であり、それが本研究の背景にある。

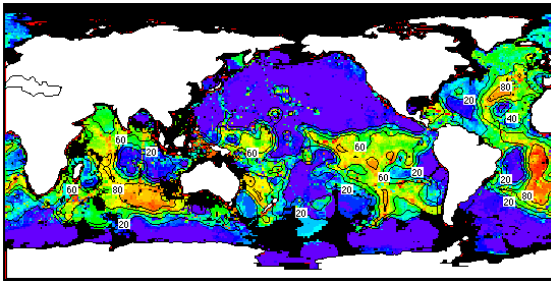


図1：表層堆積物に含まれる炭酸カルシウムの濃度。多くの海域が20%以下(青色/濃色海域)で、放射性炭素年代測定が可能なほどの炭酸カルシウム殻化石を含んでいない。これまでの古海洋研究は、主として緑色～赤色(薄色)の海底でえられた堆積物で行われてきた。

その一方で、研究代表者はこれまで、堆積物中の脂肪酸(主として炭素数14, 16, 18の直鎖飽和脂肪酸)を単離・精製し、その放射性炭素年代測定法を開発し、堆積物の年代測定に応用してきた(Ohkouchi et al., 2003, 2008; Yamane et al., 2014)。その後、研究代表者と連携研究者の横山は、脂肪酸の高速液体クロマトグラフィーを用いた単離・精製法を開発するとともに、東京大学タンデム加速器研究施設(MALT)において放射性炭素年代の微量測定に成功した($\sim 100 \mu\text{gC}$, Yokoyama et al., 2010)。その後、これら両方の技術を合わせることによって、南極縁辺海で採取された堆積

物中の脂肪酸の放射性炭素年代測定を数多くの堆積物コアについて行ってきた。その結果、西南極氷床が完新世後期に大きく後退していたことを初めて明らかにした(Yokoyama et al., 2016)。西南極氷床は底面が海底下にある海洋氷床であるため、地球温暖化にともなう融解が懸念されている。その意味で、(近)過去の西南極氷床の動態を知ることは、将来の海面上昇を論じるうえで重要な情報となる。

2. 研究の目的

このような背景のもとで、南極海堆積物の「正確な」年代を測定するために、本研究では、堆積物中に多量に含まれるアミノ酸の放射性炭素年代測定法を確立することを目的とした。アミノ酸は堆積物中に脂肪酸よりも高い濃度で含まれているため、理論的にはより少量の試料量($\sim 1 \text{ g}$)で年代測定が可能となる。このアミノ酸の年代測定のためにはまず、堆積物などの天然物中からアミノ酸の抽出、分離、単離、精製といった一連の操作を確立することが必要となる。これまで、このような試みを行った研究例は全くなく、本研究はアミノ酸の単離・精製という基本的な操作から確立することが必要となる。

3. 研究の方法

研究の手順として、堆積物などの天然物中からアミノ酸を抽出し、各アミノ酸を単離・精製する方法論の確立をまず行う。その詳細に関しては、本研究の中心的なテーマでもあり、以下の研究成果で述べる。

各アミノ酸を単離・精製したうえで、各々の試料は微量グラファイト生成ラインにおいて燃焼および還元を経てグラファイト化され、放射性炭素年代を測定した。放射性炭素年代測定は、東京大学大気海洋研究所のシングルステージ加速器質量分析計を使用させていただいた。微量放射性炭素年代測定に関しては、Yokoyama et al. (2010)に記載された方法論に従って行った。

試料としては、まず20種類のタンパク質アミノ酸にヒドロキシプロリン(Hyp)を加えた21種類のアミノ酸を(株)和光純薬から購入した。これらは、分析法の確立の際に用いる標準試料として利用するものである。これらのアミノ酸は、研究室でさらに粉末・均一化された後、個々に放射性炭素年代を測定した。

実際に分析する天然試料として、堆積物を対象とする前に、正確な年代が独立で明らかにされている人類学的試料を用いた。試料は、現代ウマ(石垣島)の骨コラーゲン、難破船(セントメアリー号)から回収されたブタの骨コラーゲン、そしてシリアの遺跡から発掘された人骨コラーゲン2試料の計4試料である。これらはいずれも、研究分担者の米田から提供されたものである。

4. 研究成果

(1) 単離・精製法の確立

誘導体化していない個々のアミノ酸を単離するために、イオンペア高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた。各種 HPLC カラムを試した結果、逆相カラム CAPCELL PAK C₁₈ MG column (20 × 250 mm, 5 μm p.s.; Shiseido Co, Ltd.) が、多くのアミノ酸をベースライン上で分離できることを明らかにした (図 2)。カラム内で同位体分別が起きることが知られているため、アミノ酸の単離はピークすべてを分取しなければならない。しかし、図 2 から明らかなように、グリシン (Gly) がセリン (Ser) と、またアスパラギン酸 (Asp), ヒドロキシプロリン (Hyp), リシン (Lys), アラニン (Ala) の 4 種類のアミノ酸が、ほぼ同時に溶出し、これらのアミノ酸については、このカラムを用いても分離できない。

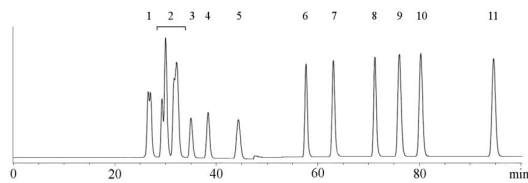


図 2 : (上) 誘導体化していない各種アミノ酸のイオンペア高速液体クロマトグラム。1: Gly, Ser, 2: Asp, Hyp, Lys, Ala, 3: Glu, 4: Arg, 5: Pro, 6: Val, 7: Met, 8: Tyr, 9: Ile, 10: Leu, 11: Phe。

そこで、それらについては他の逆相カラム Primesep A column (10 × 250 mm, 5 μm p.s.; SIELC Technologies Inc.) を用いて分離できることを明らかにした (図 3)。移動相は、いずれも蒸留水 (含 0.1% トリフルオロ酢酸) とアセトニトリル (含 0.1% トリフルオロ酢酸) である。

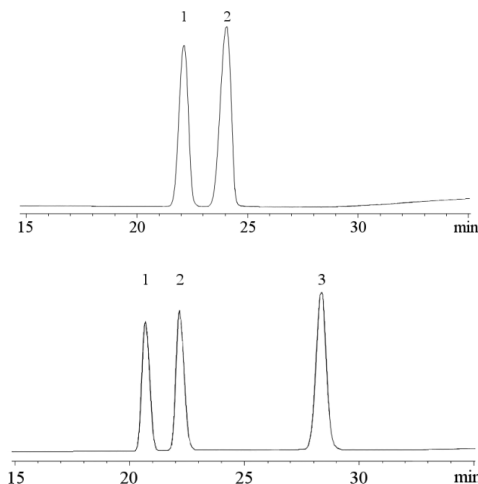


図 3 : (上) 1 回目の HPLC で分離できないグリシンとセリンを 2 回目の HPLC によって分離した際の HPLC ク

ロマトグラム。1: Gly, 2: Ser (下) 同じく 1 回目の HPLC で分離できないアスパラギン酸, ヒドロキシプロリン, アラニンを分離した 2 回目の HPLC クロマトグラム。1: Asp, 2: Hyp, 3: Ala。横軸はいずれも保持時間 (分)。

HPLC で分離し分取したアミノ酸画分をそのまま凍結乾燥すると、イオンペア剤として移動相に含まれている微量のトリフルオロ酢酸が残存してしまう (図 4 の左端図)。トリフルオロ酢酸の残存を抑えるために、あらかじめ微量の 0.1% 塩酸を加えて pH を下げた後凍結乾燥を行った。その結果、「汚染炭素量」を 0.39 μgC にまで軽減することができた。その画分には、アミノ酸以外の「汚染炭素」が含まれている。これは、「カラム・ブリード」と呼ばれるカラム担体起源の物質であると考えられる。そのため、放射性炭素を測定する前に、それらを除去する必要がある。そこで、HPLC で単離された画分について液-液分離 (L/L extraction) および再結晶化 (Recrystallization) を行うことにより、アミノ酸がかなり高い純度で精製できることを明らかにした (図 4)。これらの一連の操作により、HPLC 単離後に当初 9.0 μgC 含まれていた汚染物質の量は、0.1-0.2 μgC にまで軽減することができた。

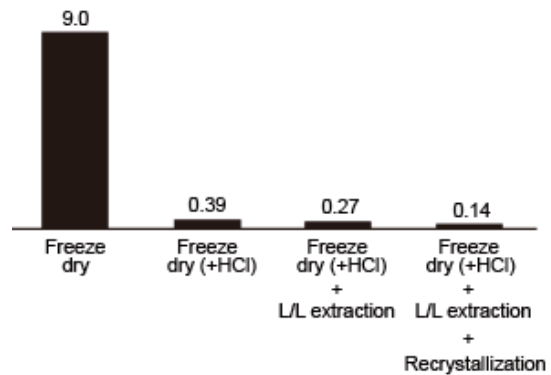


図 4 : HPLC によって単離したアミノ酸を精製する過程における、汚染炭素量の減少。

(2) 放射性炭素年代の評価

実際に、市販の標品アミノ酸を用いて、放射性炭素年代測定を行った。上述の単離・精製プロセスを経てアミノ酸を精製し、実際の放射性炭素測定を行い、期待される年代 (ボトル・アミノ酸の年代) と、単離・精製後の年代とを比較した。この単離・精製法によって、期待される年代にほぼ一致する結果を得た (図 4)。ただし詳細を見ると、期待される年代に対してモダンの試料は Fm (Fraction modern) が低めに、デッド (¹⁴C を含まない) の試料は Fm が高めに出現している。その原因としては、極微量の汚染炭素が含まれていることと、放射性炭素年代測定時の安定同位体補正が十分でないことに起因すると現在考えている。

図 4 には、年代のわかっている 4 試料の天

然試料についての測定結果も示した。これは中間的な年代をもつが、それらは期待される年代とよく一致している。

以上の結論として、想定よりも大幅に時間超過したものの、天然物中からアミノ酸を単離・精製する方法論を開発することに成功した。しかし「正確な」年代測定という観点からすると、まだ改良する余地があると考えている。特に、シングルステージ加速器測定時における¹³C補正について、そのプロトコルを改良する必要があると考えられる。近年、いくつかのラボで微量放射性炭素年代測定が始まっている中で、いずれのラボも似た問題を抱えており、今後は加速器側の問題を解決することによって、堆積物の年代決定法に活用されていくことになるだろう。

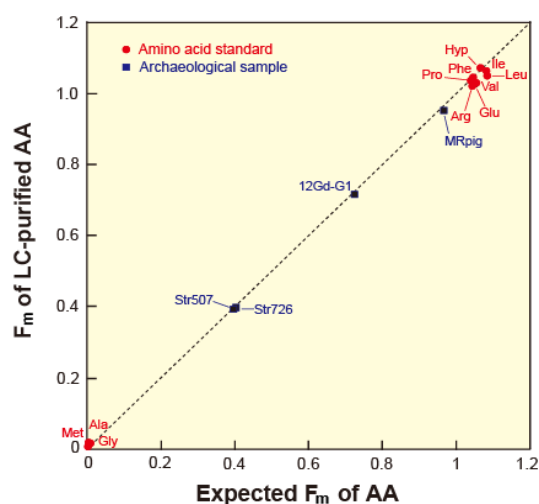


図5：単離・精製されたアミノ酸の年代測定結果。横軸は期待される年代で、縦軸は測定結果。

【引用文献】

Ohkouchi et al. (2003) *Radiocarbon*, 45, 17-24.

Ohkouchi et al. (2008) *Quaternary Geochronology*, 3, 235-243.

Yamane et al. (2014) *Radiocarbon*, 56, 1-9.

Yokoyama et al. (2010) *Radiocarbon*, 52, 310-318.

Yokoyama et al. (2016) *Proceedings of National Academy of Science*, 113, 2354-

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計10件)

Kruger, B.R., Werne, J.P., Branstrator, D.K., Hrabik, T.R., Chikaraishi, Y., Ohkouchi, N., and Minor, E.C. (2016) Organic matter transfer in Lake Superior's food web: Insights from bulk and molecular stable isotope and radiocarbon analyses. *Limnology and Oceanography*, **61**, 149-164. [査読有り](#)

Yokoyama, Y., Yamazaki, T., Miyairi, Y., Anderson, J. B., Koizumi, M., Suga, H., Kusahara, K., Hasumi, H., Southon, J. R., and Ohkouchi, N. (2016) Widespread collapse of the Ross Ice Shelf during the late Holocene. *Proceedings of National Academy of Science, USA*, **113**, 2354-2359. [査読有り](#)

Isaji, Y., Kawahata, H., Ohkouchi, N., Murayama, M., and Tamaki, K. (2015) Different response to Indian monsoon between inner and outer region of the Gulf of Aden recorded in the deep-sea sediments. *Journal of Geophysical Research-Ocean*, **120**, 7253-7270, doi:10.1002/2005JC010982. [査読有り](#)

Isaji, Y., Kawahata, H., Ohkouchi, N., Murayama, M., and Tamaki, K. (2015) Terrestrial environmental changes around the Gulf of Aden over the last 210 kyr deduced from the sediment *n*-alkane record: Implications for the dispersal of *Homo sapiens*. *Geophysical Research Letters*, **42**, 1880-1887, doi:10.1002/2015GL063196. [査読有り](#)

Ishikawa, N. F., Yamane, M., Suga, H., Ogawa, N. O., Yokoyama, Y., and Ohkouchi, N. (2015) Chlorophyll *a* specific $\delta^{14}\text{C}$, $\delta^{13}\text{C}$, and $\delta^{15}\text{N}$ values in stream periphyton: implications for aquatic food web studies. *Biogeosciences*, **12**, 6182-6789. doi:10.5194/bg-12-6781-2015. [査読有り](#)

Takano, Y., Chikaraishi, Y., and Ohkouchi, N. (2015) Isolation of underivatized amino acids by ion pair high performance liquid chromatography for high precision measurement of nitrogen isotopic composition of amino acids. *International Journal of Mass Spectrometry*, **379**, 16-25. [査読有り](#)

Itahashi, Y., Chikaraishi, Y., Ohkouchi, N., and Yoneda, M. (2014) Refining the paleo food web reconstruction with the nitrogen isotopic composition of amino acids from bone collagen: A case study with archaeological herbivores from Tell el-Kerkh, Syria. *Geochemical Journal*, **48**, e15-e19. [査読有り](#)

Maki, K., Ohkouchi, N., Chikaraishi, Y., Fukuda, H., Miyajima, T., Nagata, T. (2014) Influences of nitrogen substrates and substrate C:N ratios on the nitrogen isotopic composition of amino acids from the marine bacterium *Vibrio harveyi*. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **140**, 521-530. [査読有り](#)

Ohkouchi, N. and Takano, Y. (2014) Organic nitrogen: Sources, fates, and chemistry. In *Treatise on Geochemistry* (Eds., P. Falkowski and K. H. Freeman), Elsevier, London, p. 251-289. [査読有り](#)

Yamane, M., Yokoyama, Y., Miyairi, Y., Suga,

H., Matsuzaki, H., Dunbar, R., and Ohkouchi, N. (2014) Compound-specific ^{14}C dating of IODP Expedition 318 core U1357A obtained off the Wilkes Land, Antarctica. *Radiocarbon*, **56**, 1009-1017. 査読有り

〔学会発表〕(計 8 件)

Ohkouchi, N. (2016) Widening the application of compound-specific isotope analysis to less volatile molecules. Goldschmidt Conference, 6月28日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Ohkouchi, N. (2016) Retreat history of West Antarctic Ice Sheet after the last glacial maximum: A critical review. 地球惑星科学連合大会, 5月24日, 幕張メッセ(千葉県・千葉市)

大河内直彦 (2016) 有機物の同位体組成: 最新の展開 第64回質量分析総合討論会, 5月19日, ホテル阪急エキスポパーク(大阪府・吹田市)

Ohkouchi, N., Yokoyama, Y., Yamane, M., Suga, H., Nagata, T., and Eglinton, T. I. (2015) Compound-specific radiocarbon analysis (CSRA) as a chronological tool for Antarctic margin sediments: An update. NIPR Symposium, 11月17日, 国立極地研究所(東京都・立川市)

Ohkouchi, N. (2015) Organic molecules as tools for Quaternary paleoclimatology. XIX INQUA Congress, 7月27日, 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

Ohkouchi, N., Chikaraishi Y, Takano Y, Ogawa NO (2014) 有機物から最大限の情報を引き出すために. 地球惑星科学連合大会(招待講演), 5月2日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

高野淑識, 力石嘉人, 大河内直彦 (2014) 「軽い」アミノ酸と地球化学の接点. 日本地球惑星科学連合大会, 5月2日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

力石嘉人, 高野淑識, 大河内直彦 (2014) アミノ酸の安定同位体比を正確かつ感度良く測定するための分析法. 日本地球惑星科学連合大会, 5月2日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

〔図書〕(計 1 件)

大河内直彦 (2015) 地球の履歴書. 新潮社, 218 p.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大河内 直彦 (Ohkouchi, Naohiko)
国立研究開発法人海洋研究開発機構・生物地球化学研究分野・分野長
研究者番号: 00281832

(2) 研究分担者

米田 穰 (Yoneda, Minoru)
東京大学・総合研究博物館・教授
研究者番号: 30280712

(3) 連携研究者

横山 祐典 (Yokoyama, Yusuke)
東京大学・大気海洋研究所・教授
研究者番号: 10359648